

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 3 月 1 日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/14560 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/29, C07K 14/415,  
C12N 5/10, A01H 5/00, C12P 21/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05722

(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 24 日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/236800 1999 年 8 月 24 日 (24.08.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリー株式会社 (SUNTORY LIMITED) [JP/JP]; 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 飯田 滋 (IIDA,

Shigeru) [JP/JP]; 〒444-0874 愛知県岡崎市竜美南2-4-1-3-21 Aichi (JP). 田中幸子 (TANAKA, Sachiko) [JP/JP]; 〒444-0802 愛知県岡崎市美合町五本松61番地 Aichi (JP). 稲垣善茂 (INAGAKI, Yoshishige) [JP/JP]; 〒444-0851 愛知県岡崎市久後崎町宮下2 城南ハイツ105 Aichi (JP).

(74) 代理人: 石田 敬, 外 (ISHIDA, Takashi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, NZ, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

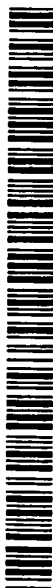
(54) Title: GENES ENCODING PROTEINS REGULATING pH OF VACUOLES

(54) 発明の名称: 液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

(57) Abstract: Genes encoding proteins having an activity of regulating the pH of vacuoles, for example, a gene originating in morning glory and encoding a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2. When inserted into a plant and expressed therein, such a gene can control the flower color via the regulation of the vacuolar pH.

(57) 要約:

液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、例えばアサガオに由来し、配列番号: 2 に示すようなアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子を植物に挿入して発現せしめることにより、液胞のpHの調節を介して花の色を制御することができる。



WO 01/14560 A1



## 明 細 書

液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

## 発明の技術分野

本発明は液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子およびその利用方法に関するものである。

## 背景技術

花き産業においては、顕花植物の新規なあるいは多様性に富んだ新品種の開発が重要であり、なかでも、花の色は花きの最も重要な形質のひとつである。交配による従来 of 育種により、さまざまな色の品種が育種されてきたが、単一の植物種がすべての色の品種を有することはまれであり、さまざまな色の品種開発が望まれている。

花の色の主な成分は、アントシアニンと総称されるフラボノイドの一群の化合物である。植物には多様なアントシアニンが存在することは知られており、それらの多くの構造が既に決定されている。アントシアニンの色は、一部は、その構造に依存している。アントシアニンの生合成に関わる酵素や遺伝子に関しても研究が進んでおり、分子生物学的手法と植物への遺伝子導入により、アントシアニンの構造を変換し、花の色を変えた例もある (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish, p.1071、Plant Cell Physiol.39 (1998) Tanaka et al, p1119.)。また、アントシアニンの色は、水溶液のpHにも依存し、同じアントシアニンでも水溶液のpHが中性から弱いアルカリ性で青く見える (現代化学、(1998年5月) 本田と斉藤、p.25)。

アントシアニンは細胞の液胞に存在するため、液胞のpHが花の色

に大きな影響を与えることも知られている (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish, Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212)。たとえば、アサガオ (*Ipomea tricolor*) においては、赤紫色のつぼみが開花したときに青くなるのは、花卉上皮細胞の液胞のpHが6.6 から7.7 に上昇するためであることが知られている (Nature, 373 (1995), Yoshida et al. p291)。

植物細胞の液胞はおもに液胞プロトン輸送ATPaseと液胞プロトン輸送ピロフォスファターゼによって制御されているとされる (The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press) が、これらのプロトンポンプが花の色にどのように関わっているかは明確ではない。また、ナトリウムイオン-プロトンアンチポーター (以下、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターと記載) が植物の液胞に存在すること、また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターは、液胞の外と中のプロトン濃度勾配に依存してナトリウムイオンを液胞内に輸送し、その際プロトンが液胞外に輸送され、プロトン濃度勾配が減少することが知られていた。

さらに、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターは、分子量約17万の蛋白質であることが示唆されていた。しかしながら、液胞のpHの制御には多くの未知の要因があり、どのようにして液胞、特に花卉液胞のpHが制御されているのかは、不明確である (以上The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press)。また、植物液胞のpHを人為的に上昇させ、産業上有用な形質が得られたこともなく、花の色との関連も不明である。

また、分子量約7万の $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子がアラビドプシスからクローニングされ、この遺伝子を導入した酵母は耐塩性を獲得したことは知られているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxiola et al. p1480 ~1485)、このアンチポーター

が植物細胞の液胞のpHを制御しているかどうか、あるいは花の色に関わっているかどうかは知られていない。

一方、ペチュニアには花卉の液胞のpH制御に関わっている遺伝子座が7種あることがわかっており、これらのうちの一つがホモの劣性になることにより花卉の液胞のpHが上昇するとされている (Plant J. 13 (1998) van Houwelingen et al. P39, Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212)。そのうちの一つPh6はすでにクローン化されていて、転写調節因子の一種であることがわかったが (Plant Cell 5 (1993) Chuck et al. p371)、実際にどのような生化学的な機構で液胞のpHを制御しているかは不明である。

また、アサガオ (*Ipomea nil*) においては、変異体の解析から花と葉の色や形に関わる遺伝子座がいくつかあり、これらのうち19が易変異性であることが知られている (植物細胞工学シリーズ5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社、Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870)。これらの内で、青色ではなく紫色の花を咲かせるようになった劣性の変異により規定される1遺伝子座をPurple遺伝子座と呼び (T. Hagiwara (1931) The genetics of flower colours in *Pharbitis nil*. J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo 51, 241-262.; Y. Imai (1931) Analysis of flower colour in *Pharbitis nil*. J. Genet., 24: 203-224.)、紫の花卉に青いセクターを生じる花を咲かせる易変性変異のアリールは、purple-mutable (pr-m) と名付けられた (J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo, 12 (1934) Imai, p479)。なお、Purple遺伝子座に由来する遺伝子をPurple遺伝子と記す。

この青い部分は劣性のpurpleからの体細胞復帰突然変異により生じたと考えられ、さらに生殖細胞復帰突然変異体も分離できる。これら復帰突然変異体の復帰突然変異により生じたアリールをここで

はPurple-revertant (Pr-r)と名付ける。このような古典遺伝学的解析は、このPurple遺伝子に関しては行われていたが、このPurple遺伝子の実体や花卉液胞のpHの調節との関連等は全く不明であった。

液胞のpHを改変できれば、たとえば液胞のpHを上昇させることにより、花の色を青くすることができるであろうと考えられる。青い色のない植物種の代表例として、バラ、キク、カーネーション、ガーベラなどがあり、これらはきわめて重要な切り花である。液胞pHの改変の重要性は認識されてきたが、いままでに花卉の液胞のpHを制御する蛋白質の実態は不明であり、これをコードする遺伝子の単離が望まれていた。

#### 発明の開示

本発明は、植物細胞の液胞のpHを制御する蛋白質の遺伝子、好ましくは液胞でプロトンを輸送する蛋白質の遺伝子、より好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子を提供しようとするものである。本発明の遺伝子を植物に導入し、発現させることで、花色を調節し、好ましくは青色化することが可能である。

従って、本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子は、好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターをコードする遺伝子であり、例えば、配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子、あるいは配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して20%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；あるいは配列番号：2

記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である。

本発明はまた、前記の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、前記のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子によってコードされる蛋白質を提供する。

本発明はさらに、前記の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞から液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子、または前記のベクターが導入された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織を提供する。

本発明はまた、前記の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞のpHを制御する方法を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、プラスミドpSPB 607の構造を示す図である。

図2は、プラスミドpSPB 608の構造を示す図である。

図 3 は、プラスミド p INA 1 4 5 の構造を示す図である。

図 4 は、プラスミド p INA 1 4 7 の構造を示す図である。

### 発明の実施の形態

アサガオの遺伝子座 Purple は優性であると花卉の色は青で、ホモの劣性となると青い花卉が紫となる。この遺伝子座が花の色に関わっていることは明らかではあるが、その機構については不明である。

まず、pr-m 変異体とその復帰突然変異体の花卉色素を化学分析したところ、両者の色素組成に差違は認められなかった。青色花アサガオの蕾は赤紫色で開花に伴って青色に変化するのは、前述のように、花卉細胞液胞の pH 変化によると考えられる。

pr-m 変異体では、開花に伴って青色に変化せず、さらに開花した花卉細胞の液胞の pH は、pr-m 変異体のほうが Pr-r に比べて低かった。それゆえ、Purple 遺伝子は開花時の花卉細胞液胞内の pH を制御し、花色を調節する遺伝子と考えられる。そこで、pr-m 変異体とその復帰突然変異体を用いて、トランスポゾン・ディスプレイ法により、まず pr-m に特異的に存在する Purple 遺伝子配列を含むゲノム DNA の断片を同定し、ついで Purple 遺伝子を同定した。今回得られた Purple 遺伝子は驚くべきことにアラビドプシスなどの  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターと相同性を持ち、pr-m 変異は Purple 遺伝子の 5' 非翻訳領域中にトランスポゾンが挿入されていた。

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号：2 に記載するアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質も、もとの蛋白質と同様の活性を維持することが知られている。従って本発明は、液胞の pH



を制御する活性を有している蛋白質である限り、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質および当該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。

本発明はまた、配列番号：1に記載の塩基配列または配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはそれらの塩基配列の一部分をコードする塩基配列に対して、ストリンジェントな条件下、例えば5xSSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。なお、適切なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えばアミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとした場合には50℃以下の温度が好ましい。

このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えば、ペチュニアやトレニア由来の遺伝子が挙げられるが、植物以外の由来であってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子はスーパーファミリーを形成しており (FEBS Lett. 424(1998) Debrov et al., pl)、アミノ酸配列で20%以上の相同性を有する (J. Biol. Chem. 272(1997) Orłowski et al., p22373)。

そこで本発明はさらに配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して約20%以上、好ましくは50%以上、例えば60%または70%以上、の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

生来の塩基配列を有する遺伝子は実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA は生来の塩基配列を有するDNA を基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR 法を用いて合成することができる。例えば修飾を導入したいDNA 断片を生来のcDNAまたはゲノムDNA の制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR 法を実施し、所望の修飾を導入したDNA 断片を得る。その後、この変異を導入したDNA 断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA 断片と連結すればよい。

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA を得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNA を所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA 断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA 断片を合成し、連結すればよい。

本発明はアサガオ由来の液胞のpH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のみに限定されるものではなく、起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、液胞においてプロトンを汲み出すトポロジーを持っていればよい。

また、得られた遺伝子は大腸菌または酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、活性を測定することにより、得られた遺伝子が液胞のpH を制御する活性を有する蛋白質をコードすることを確認することができる。さらに、当該遺伝子が発現させることにより、遺伝子産物である液胞のpH を制御する活性を有する蛋白質を得ることができる。あるいはまた、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列に対する抗体を用いても、液胞のpH を制御する活性を有する蛋白質を

得ることができ、抗体を用いて他の生物の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をクローン化することもできる。

従って本発明はまた、前述の遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバシルス、スブシルス (*Bacillus subtilis*) など常用の宿主を用いることができる。真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。

酵母としては例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属微生物、例えばサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス、ニガー (*Aspergillus niger*)、ペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含む。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えば *trc* プロモーター、*tac* プロモーター、*lac* プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、*PH05* プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては

例えばアミラーゼプロモーター、trpCプロモーター等が使用される。

また動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常用に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も常法に従って行うことができる。

前記の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養、栽培または飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とするタンパク質を回収、精製することができる。

さらに本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、具体的には、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子を導入することにより、色合いが調節された植物もしくはその子孫又はこれらの組織に関するものであり、その形態は切り花であってもよい。本発明で得た液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を用いると、液胞においてプロトンの細胞質への汲み出しとナトリウムイオンの汲み入れを行うことができ、液胞内に蓄積しているアントシアニンを青くでき、結果として花の色を青くすることができる。

また、本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを下げることも可能である。現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法やコサプレッション法によって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。

形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション

、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユウカリ、サツマイモ、ダイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

## 実施例

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

### 実施例 1. 生殖細胞復帰突然変異体の取得

生殖細胞復帰突然変異体の取得に関しては、すでに報告がある (植物細胞工学シリーズ 5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社、Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499)。

遺伝子型 (Pr-r/pr-m) を有するアサガオ (Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499) を自家受粉し、後代の種子を蒔き、それら自殖後代の花を観察して、復帰突然変異により青花を咲かせる個体を選抜し、さらにこの生殖細胞復帰突然変異体の自殖後代で、紫花を咲かせる分離体を得られるか否かでホモかヘテロかを検証し、遺伝子型 (Pr-r/ Pr-r) および (pr-m/pr-m) を有するものを選択した。

### 実施例 2. 復帰変異体花卉のアントシアニン

アサガオに含まれるアントシアニンはおもにヘブンリブルーアン

トシアニンであり、その他にいくつかのアントシアニンが含まれる (Phytochemistry 31 (1992) Lu et al. P659)。実施例 1 で得られた Pr-r/ Pr-r 株と pr-m/pr-m 株の開いた花卉を同様に解析したところ、両者に含まれるアントシアニンはほぼ同一であった。

セロハンテープを表側の花卉に貼り、剥がすことにより一層の上皮細胞だけを回収し、ここから細胞液をメスなどで掻き取り遠心して搾汁を得た。搾汁をホリバ B212 pH メーター (株式会社堀場製作所) にて pH を測定した。Pr-r/ Pr-r 株の花弁上皮細胞の pH は約 7.1 であったのに対し、pr-m/pr-m 株の花弁上皮細胞の pH は約 6.5 であった。この結果は、purple の変異による花色の変化は、アントシアニンの構造によるものではなく液胞の pH の変化によるものであることを示す。

### 実施例 3. pr-m に特異的に存在するゲノム断片の単離

遺伝子の単離にはトランスポゾンディスプレイ法 (たとえば Plant J. 13 (1998) Frey et al. p 717, Plant J. 13 (1998) Van den Broeck et al. p121) あるいは類似の方法 (植物細胞工学シリーズ 7 (1997)、土生ら、p144, 秀潤社) を用い、pr-m/pr-m 株と Pr-w/pr-m 株には存在し、Pr-r/ Pr-r 株と野性株には存在しない DNA のバンドを探した。アサガオにおいては Tpn1 関連のトランスポゾンが主に易変異性に関与していると考えられるので、ここでも Tpn1 関連のトランスポゾンに着目した。

具体的には、pr-m/pr-m 株から染色体 DNA を抽出し、125ng を 20  $\mu$ l 中で MseI で消化した。消化した DNA に 80 pmole の MseI アダプター (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' (配列番号: 3) と 5'-TACTCAGGACTCAT-3' (配列番号: 4) をアニールしたもの) を 25  $\mu$ l 中で 20℃ で 2 時間付加した。75℃ で 10 分間保持した後、-20℃ で保管した。これを 10 倍希釈した後、2  $\mu$ l を鋳型とし、これを 4.8 pmole の TIR プ

ライマー (5'-TGTGCATTTTCTTGTAGTG-3' (配列番号: 5)、トランスポゾンTpn1の末端逆位繰り返し配列を含む) と4.8 pmole のMseIプライマー (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3') (配列番号: 6) を用いて20  $\mu$ l 中でPCR により増幅した。

PCR は、Taq ポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 94℃ 0.5 分、56℃ 1 分、72℃ 1 分を1 サイクルとし、20サイクル反応し、10倍に希釈した。このうち2  $\mu$ l を鋳型として、4.8 pmole のTIR +N プライマー (5'-TGTGCATTTTCTTGTAGN-3' (配列番号: 7) N=A, C, G またはT. 混合ではなく4 種合成する。) と4.8 pmole のMseI+Nプライマー (5'-GATGAGTCCTGAGTAAN-3', (配列番号: 8) N=A, C, G またはT. 混合ではなく4 種合成する。5'端をフルオロセインで標識 (アマシャムファルマシアバイオテック株式会社Vistra fluorescence 5'-オリゴラベリングキットを使用)) を用いて20  $\mu$ l 中でPCR を行った。

反応はそれぞれのプライマーの組み合わせで行うため16反応をおこなう。PCR は、94℃ 0.5 分、65℃ 1 分 (1 サイクルごとに0.7℃ずつ下げる)、72℃ 1 分を1 サイクルとし、13サイクル反応し、さらに94℃ 0.5 分、56℃ 1 分、72℃ 1 分を1 サイクルとし、13サイクル反応した。同様の操作をPr-r/ Pr-r株から得た染色体DNA についても行い、DNA シークエンサー377 (ピーイーバイオシステムズジャパン株式会社) のシーケンシングゲルにて電気泳動を行い、FM BI011 (宝酒造株式会社) を用いてバンドを検出した。

Pr-r/ Pr-r株とpr-m/pr-m 株由来のバンドを比較したところ、約130bp のDNA 断片がpr-mを有する株に特異的に発現していた。この130bp のDNA 断片を回収し、20 pmole TIRプライマーと20 pmole MseI プライマーを用いてPCR (94℃ 0.5 分、56℃ 1 分、72℃ 1 分を1 サイクルとし、30サイクル反応) により増幅し、pGEM-Tベクター

(Promega Corporation) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。その配列は、

5'-TGAGCATTTTTCTTGTAGTG CTGAGATTTTCCTCCATTTGTCTGAAGCTCTTCATCCTTCAACAC  
TACCCCCACATCTCACCTTTCAAG GTCCAATCTTTATCATTATCT TACTCAGGACTCATCGTC-3'  
 (配列番号：9)

であった(1本下線部は使用したプライマー、2本下線はエクソン、その他はイントロンに対応)。配列番号：9に記載の配列をプローブとしてノザン解析を行ったところ、Pr-rを有するアサガオの蕾には約2.3kbの転写産物が存在したが、pr-m/pr-m株には対応する転写産物は存在しなかった。従って、この2.3kbの転写産物がPurple遺伝子に対応することがわかった。

#### 実施例4. cDNAの単離

野生株アサガオ(Pr-w/Pr-w)由来のcDNAライブラリー(Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p375)の約600万個クローンを130bp DNA断片をプローブとしてスクリーニングし、2クローンの陽性クローンを得た。そのうち1クローンは、2237 bpのcDNAを持ち、その中には1626bpからなるオープンリーディングフレームが見られた(配列番号：1)。予測されるアミノ酸配列は、酵母とアラビドプシスのNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> アンチポーター(それぞれNhxl, AtNhxl, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxiola et al. p1480~1485)に対して29.3%、73.4%の同一性を示した。

この結果からアサガオのPurple遺伝子はNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> アンチポーターをコードしていることが判明した。なお、アラビドプシスから得られたNa<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> アンチポーターは、酵母において耐塩性を与えるタンパク質として注目されているが、Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> アンチポーターと花の色との関連が見出されたのは今回が初めてである。



### 実施例 5 . 酵母Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> アンチポーター変異体の相補実験

アサガオのPurple遺伝子がコードする推定アミノ酸配列は、酵母やアラビドプシスのNa<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> アンチポーターのそれらに相同性がある。そこで実際に、アサガオPurple遺伝子産物が、Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> アンチポーター蛋白として機能できるか酵母Na<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> アンチポーター変異体を用いた相補実験で確認した。

まず最初に、以下の2種類のDNA断片を合成した。

CBSC1-Linker (22mer) 5' - CGA TAG ATC TGG GGG TCG ACA T -3'

(配列番号：12)

CSBC2-Linker (22mer) 5' - CGA TGT CGA CCC CCA GAT CTA T -3'

(配列番号：13)

この2つのDNA断片からは、ClaI-BglII-SalI-ClaIという制限酵素部位をもつリンカーができる。pYES2 ベクター (Invitrogen Corporation) のClaI部位にBglII サイトがURA3遺伝子側に位置するように定法にしたがって上記のリンカーを挿入し、プラスミドpINA145を作成した(図3)。プラスミドpJJ250 (Jones and Prakash, 1990, Yeast, 6, 363-366) をBamHI とSalIで消化して得られる2kbのDNA断片をBglII とSalIで消化したプラスミドpINA145とライゲーションし、プラスミドpINA147を作成した(図4)。プラスミドpINA147のGAL 1プロモーターの制御下にPurple cDNAを連結してプラスミドpINA151を作成した。pINA147およびpINA151をNa<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> アンチポーターの変異株である酵母R101株にそれぞれ形質転換した。酵母R101株はNa<sup>+</sup> -H<sup>+</sup> アンチポーター遺伝子の変異により400mM NaCl添加APG培地 (Nass et al., 1997, J. Biol. Chem., 272, 26145; Gaxiola et al., 1999, 96, 1480-1485) では生育できない。pINA147を形質転換したR101株も同様に生育できなかったが、pINA151を形質転換したR101株のみ400mM NaCl添加APG培地でも生育が

可能であった。この結果から、アサガオPurple遺伝子産物は $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター機能を有していることが明らかになった。

#### 実施例 6 . 植物での発現ベクターの構築

アサガオPurple cDNA10ng を鋳型として、合成プライマーPR-5 (5'-GGGATCCAACAAAAATGGCTGTCGGG-3') (配列番号: 10) とPR-3 (5'-GGGTCGACTAAGCATCAAAACATAGAGCC -3') (配列番号: 11) を用いてPCRを行った。ポリメラーゼは、Taq ポリメラーゼ (東洋紡績株式会社) を使用し、95℃ 45秒反応後、95℃ 45秒、50℃ 45秒、72℃ 45秒を1 サイクルとし、25サイクル反応し、さらに72度で10分反応した。得られた約1.6 kbのDNA 断片をpCR2.1-Topo (クロンテック株式会社) にライゲーションし、pCR-purpleとした。このプラスミド上のPurple cDNA の塩基配列にPCR によるエラーがないことを確認した。

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37 (1996) Mitsuhara et al . p49) をSacIで消化し、平滑末端化した後、XhoIリンカー (東洋紡績株式会社) を挿入し、得られたプラスミドをpBE2113-GUSxとした。これをEcoRI とHindIII で消化して得られる約2.7 kbのDNA 断片をpBinPLUSのHidIIIとEcoRI 消化物と連結し、得られたプラスミドをpBEXP とした。

一方、pCGP484 (特表平 8 - 5 1 1 6 8 3 号公報) をHindIII とXbaIで消化して得られる約1.2kb のDNA 断片と、pCR-purpleをXbaI とSalIで消化して得られる約1.6kb のDNA 断片と、pBEXP をHindIII とXhoIで消化して得られる約13kbのDNA 断片をライゲーションし、pSPB607 を得た (図 1) 。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNA は、キングョソウ由来カルコンシンターゼプロモーターと、アグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼター

ミネーターの制御下にある。

また、pCGP669（特表平8-511683号公報）をHindIIIとBamHIで消化して得られる約0.8kbのDNA断片と、pCR-purpleをBamHIとSalIで消化して得られる約1.6kbのDNA断片と、pBEXPをHindIIIとXhoIで消化して得られる約13kbのDNA断片をライゲーションし、pSPB608を得た（図2）。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNAは、ペチュニア由来カルコンシンターゼAプロモーターと、アグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼターミネーターの制御下にある。

このようにして得られた発現ベクターを用いて植物の形質転換を行うことにより、液胞のpHを制御し、花色を調節することができる。

#### 実施例7. Purple遺伝子のホモログの単離

ペチュニア（*Petunia hybrida* 品種 Old Glory Blue）、ニーレンベルギア（*Nierembergia hybrida* 品種 NB 17）、トレニア（*Torenia hybrida* 品種 サマーウエーブ・ブルー）の花弁由来cDNA libraryをcDNA synthesis kit（Stratagene USA）を用いてそれぞれ作成した。作成方法は、製造者の推奨する方法に従った。それぞれ約20万個のクローンを定法に従って、スクリーニングした。なお、メンブレンの洗浄には、5 x SSC, 0.1% SDS 水溶液を用い、50℃で10分間、3回行った。得られた陽性クローンのうち、それぞれの最長クローンの塩基配列を決定した。ペチュニアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：14及び15に、ニーレンベルギアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：16及び17に、そしてトレニアのクローンの塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：18及び19に示す。ペチュニア、ニ

ーレンベルギア及びトレニアのPurple遺伝子のホモログは、アサガオのPurple遺伝子に対してアミノ酸レベルでそれぞれ75%、76%及び71%の同一性を示した。

アサガオPurple遺伝子がコードする $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターとアラビドプシスのAtNhx 1 がコードする $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターのアミノ酸配列の同一性が約73%であることから、ここで得たベチュニア、ニーレンベルギア、トレニアのPurple遺伝子のホモログは、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターをコードしていると判断される。

#### 実施例 8. アサガオPurple 染色体クローンの単離

変異型アサガオ (pr-m/pr-m) と復帰型アサガオ (Pr-r/Pr-r) の染色体DNA をBglIII で切断後、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、アサガオPurpleのcDNAをプローブにそれぞれゲノミックサザン解析を行った。その結果、変異型アサガオでは無く、復帰型アサガオには存在する約 7.5kbのバンドを検出した。

野性型アサガオ (Pr-w/Pr-w、KKZSK2系統) の染色体DNA 50  $\mu\text{g}$  をBglIII で切断後、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、約 7~9kb の部分を切り出して GENE CLEAN III KIT (BI0101) を用いて DNAを抽出した。この DNAを $\lambda$  Zap express vector (Stratagene USA) にライゲーションし、アサガオ Purple のcDNAをプローブとしてスクリーニングした。得られたポジティブクローンの塩基配列を決定したところ、この約 7.5kbのDNA 断片にPurpleのプロモーター上流約6.3kb とエキソン 3 の途中までの領域が存在した。この配列のうちPurple遺伝子の開始コドンまでの配列を配列番号: 20 に示す。

Purple遺伝子は、アサガオの開花約24時間前にのみ強く発現が誘導されること、また、5' -非翻訳領域へのトランスポゾンの挿入により、Purple遺伝子の発現が抑制されることが判明している。このことから、得られたPurple遺伝子のプロモーター領域には、アサ

ガオ花卉で時期特異的、器官特異的にPurple遺伝子を発現させるために必要な因子を含んでいる。このプロモーター領域の下流に目的遺伝子を配置すれば、時期特異的、器官特異的に目的遺伝子の発現が制御できる。

#### 産業上の利用可能性

本発明により得られた遺伝子が液胞のpHおよび花の色の調節に関わっていることがはじめて明らかとなった。また、本発明の遺伝子を花卉で発現することにより、液胞のpHを上昇させ、花の色を青く変化させることができる。また、本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを低下させ、花の色を赤く変化させることができる。液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子としては、本発明において得られたアサガオ由来のものだけでなく、他の生物の同様な遺伝子も用いることができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 植物細胞の液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
2. 配列番号：2記載のアミノ酸配列を有する植物細胞の液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
3. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
4. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して20%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項1に記載の遺伝子。
5. 配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して70%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項1に記載の遺伝子。
6. 配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項1に記載の遺伝子。
7. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。
8. 請求項7記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
9. 請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。
10. 請求項8記載の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞から液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質を採取す

ることを特徴とする該蛋白質の製造方法。

1 1 . 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子、または請求項 7 記載のベクターが導入され形質転換された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織。

1 2 . 請求項 1 1 に記載の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花。

1 3 . 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子、または請求項 7 記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞の p H を制御する方法。

1 4 . 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の遺伝子、または請求項 7 記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法。





Fig. 1

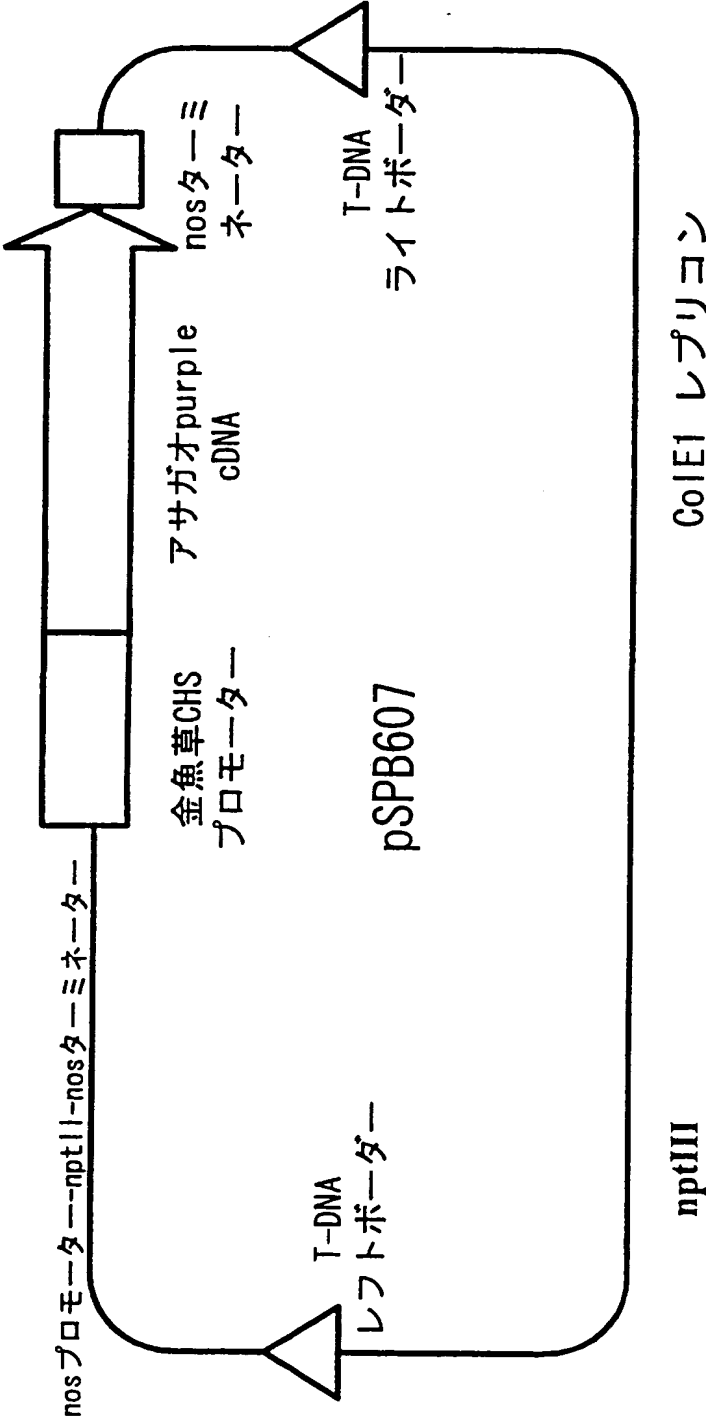




Fig. 2

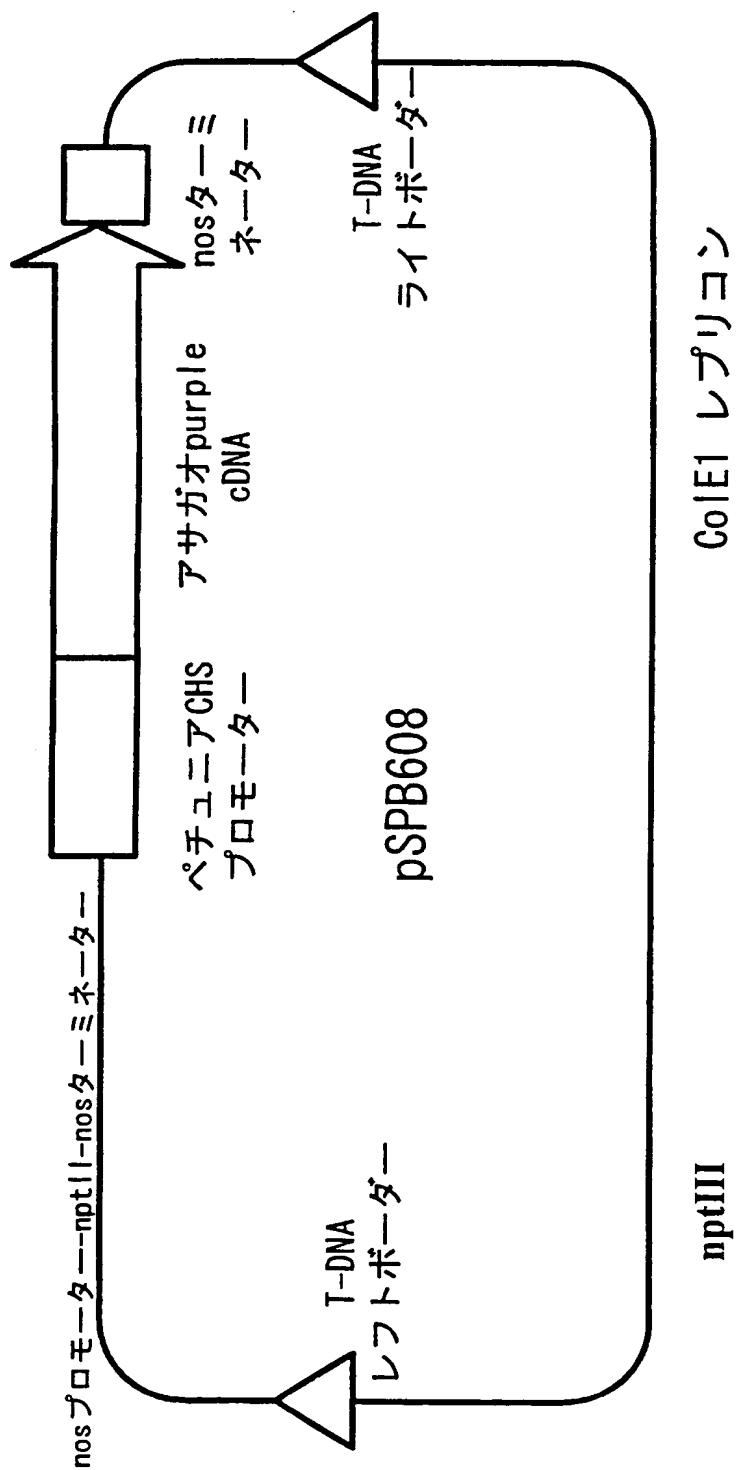




Fig.3

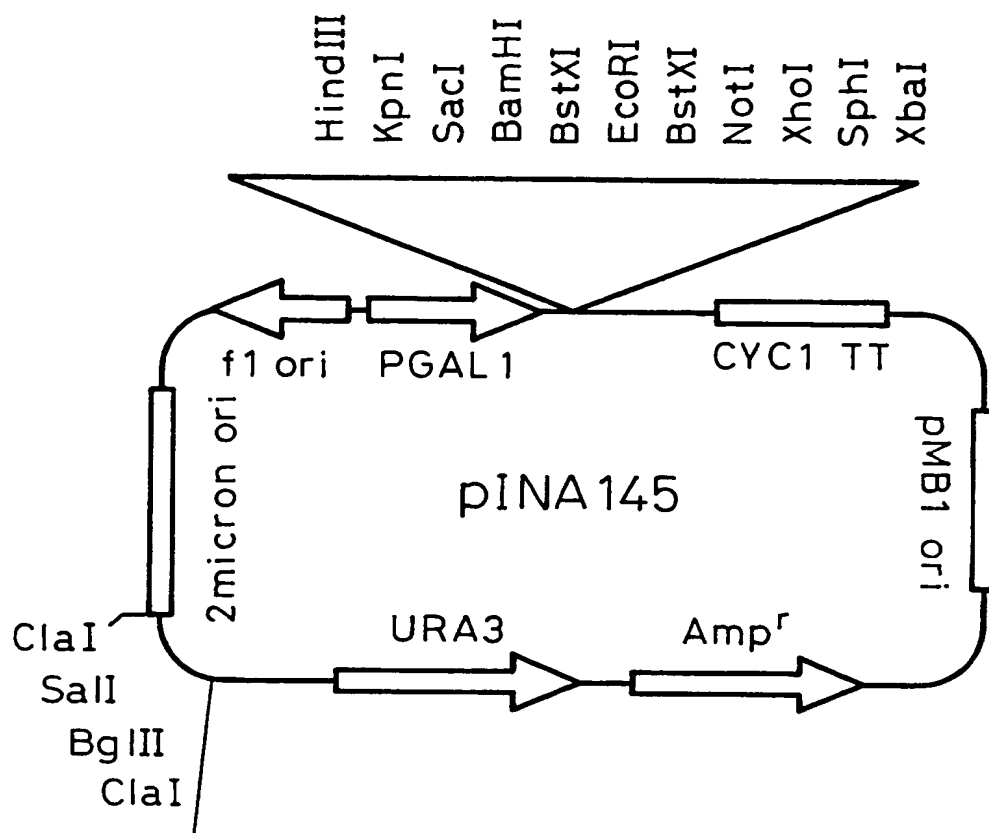
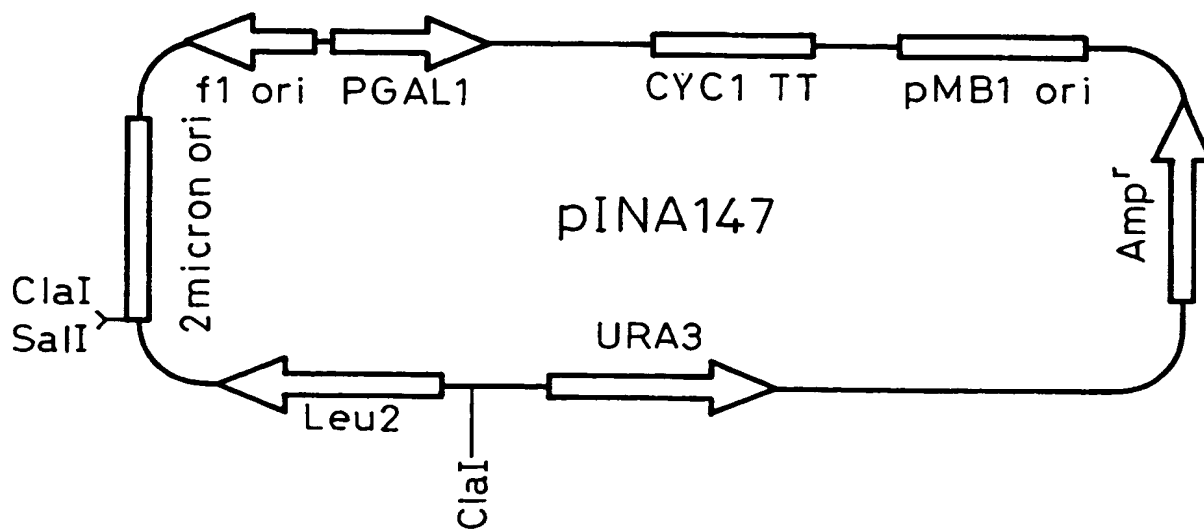


Fig.4





## SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > SUNTORY LIMITED  
 < 1 2 0 > Gene coding for protein having an activity to  
 control pH in vacuoles  
 < 1 3 0 > 994020  
 < 1 6 0 > 20  
 < 2 1 0 > 1  
 < 2 1 1 > 2237  
 < 2 1 2 > DNA  
 < 2 1 3 > Ipomea nil  
 < 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein  
 having an activity to control pH in vacuoles  
 < 4 0 0 > 1

agaatgtagg ctacagaaat tttcagacag atagatacat aaatccgtat aatagagaca 60  
 gagaacaga aaaagagaga gtcacgttaa tcctgagatt ttctccatt tgtctgaagc 120  
 tcttcatacct tcaacactac cccacatct cacctttcaa gtgatttgta tgttttcggg 180  
 agggattgga atgggcaacc cggatatgtg aacagaaacc acgacattgg gaaaagattt 240  
 attgcaaaaa ttgttttgat tgttttggat tttgtggtag aaaaagggga agaacaaaa 299  
 atg gcg ttc ggg ttg tct tct ttg ctc caa aat tcg gat ttg ttc acg 347  
 Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr  
 1 5 10 15  
 tct gat cat gct tcc gtt gtg tcg atg aac ctc ttt gtg gcg ttg ctt 395  
 Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu  
 20 25 30  
 tgc gca tgc att gtt ctt ggc cat cta ctc gag gag aat cgc tgg gtg 443  
 Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val  
 35 40 45





aac gaa tcc att act gcc ctt ata att ggt ttg tgc acc gga gtt gta	491
Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val	
50 55 60	
att ttg ctc ctt agc gga gga aag agt tca cat ctt ctc gtc ttt agc	539
Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser	
65 70 75 80	
gaa gat ctt ttc ttt ata tat ctc ctg cca cct ata ata ttc aat gcg	587
Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala	
85 90 95	
ggg ttt caa gtg aaa aag aag cag ttt ttc gtg aac ttc atg aca att	635
Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile	
100 105 110	
atg ctg ttt gga gct att ggc aca ctt att agc tgt tct att ata tca	683
Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser	
115 120 125	
ttt ggt gcg gtc aaa att ttc aag cac tta gac att gac ttt ctg gat	731
Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp	
130 135 140	
ttt gga gat tat tta gca att ggt gcg ata ttt gct gca acc gat tct	779
Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser	
145 150 155 160	
gtt tgc aca ttg cag gtg ctc agt cag gat gag acg ccc cta ctt tac	827
Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr	
165 170 175	
agt ctc gtg ttt gga gaa ggg gtc gtc aat gat gct aca tct gtg gtc	875
Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val	
180 185 190	



ctt ttt aat gct att caa agt ttt gac atg act agt ttt gat cca aaa 923  
 Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys  
 195 200 205  
 att ggg ctt cat ttc att gga aac ttc ttg tat tta ttt ctc tcg agc 971  
 Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser  
 210 215 220  
 act ttt ttg ggc gtg gga att gga ctg ctt tgt gct tat att atc aaa 1019  
 Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys  
 225 230 235 240  
 aag cta tac ttt ggc agg cac tca acc gat cgt gag gtt gcc ctt atg 1067  
 Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met  
 245 250 255  
 atg ctc atg tct tac ttg tct tat ata atg gcc gag tta ttc tat cta 1115  
 Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu  
 260 265 270  
 agc ggc ata ctt act gta ttc ttc tgt gga att gtc atg tct cat tat 1163  
 Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr  
 275 280 285  
 acc tgg cac aat gtt acc gag agc tca agg gtc act act agg cat tcc 1211  
 Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser  
 290 295 300  
 ttt gca act ctg tca ttt gtc gca gag aca ttt atc ttc ctc tat gtt 1259  
 Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val  
 305 310 315 320  
 ggt atg gat gcc ttg gat atc gag aaa tgg aaa ttt gtg aaa aat agt 1307  
 Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser  
 325 330 335



cag gga cta tca gtt gca gtg agc tca ata ttg gta ggc cta atc tta 1355  
 Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu  
 340 345 350  
 gta ggc aga gct gcg ttc gta ttc ccc ttg tcg ttt tta tcc aac tta 1403  
 Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu  
 355 360 365  
 gca aag aaa aac tct tcg gac aag ata tcc ttt agg caa caa ata ata 1451  
 Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile  
 370 375 380  
 att tgg tgg gct ggc cta atg aga ggc gcc gtc tca ata gca ctt gcg 1499  
 Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala  
 385 390 395 400  
 tat aat aag ttt aca acc tcg ggg cat acg tca ttg cac gag aac gca 1547  
 Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala  
 405 410 415  
 ata atg att aca agt act gtt acg gtt gtt ctg ttc agc aca gtt gta 1595  
 Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val  
 420 425 430  
 ttc ggg ttg atg acg aag cct ctg ata aac ctt ctg cta ccc ccg cac 1643  
 Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Leu Pro Pro His  
 435 440 445  
 aag cag atg cca agc ggt cat tcg tca atg aca aca tcc gaa ccc agt 1691  
 Lys Gln Met Pro Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser  
 450 455 460  
 agt ccg aag cac ttc acg gtg cca ctc ctg gac aac caa cct gac tca 1739  
 Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser  
 465 470 475 480



gaa agc gat atg ata acc gga cct gag gtt gct cga cca act gcc ttg 1787

Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu

485

490

495

cgc atg ctg cta agg acg cca acc cac acc gtg cac cgc tac tgg cgt 1835

Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg

500

505

510

aag ttt gat gat tcg ttt atg cgt ccc gtg ttt ggc ggg cgg gga ttc 1883

Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe

515

520

525

gtt ccg ttt gtc gcg ggc tca cca gtt gag cag agc cct aga tga 1928

Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg

530

535

540

ggtacaaagt acaaacaaga cactgttgct gggtgaaata gtgtaagttg tatcatagtt 1988

gattctgggt gccctctta tgaaatgggc tgggtgaaag tcttctcact agctaggttg 2048

cattgcattg ctacttcata aatgttttat tttattttgt aaatgttggt gcattttagg 2108

tacttgtatt aacacctcat ttgtagcata ttatttggtg cagagtattt tttttatgaa 2168

acaataatgg ctgaattatc aatttggctc tatgttttga tgcttagtaa aaaaaaaaaa 2228

aaaaaaaaa 2237

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 542

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Ipomea nil

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an  
activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 2

Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr

1

5

10

15

5 / 3 9





Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu  
 20 25 30  
 Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val  
 35 40 45  
 Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val  
 50 55 60  
 Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala  
 85 90 95  
 Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile  
 100 105 110  
 Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser  
 115 120 125  
 Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp  
 130 135 140  
 Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser  
 145 150 155 160  
 Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr  
 165 170 175  
 Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val  
 180 185 190  
 Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys  
 195 200 205  
 Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser  
 210 215 220



Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met  
    245                                  250                                  255  
 Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu  
    260                                  265                                  270  
 Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr  
    275                                  280                                  285  
 Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser  
    290                                  295                                  300  
 Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val  
 305                                  310                                  315                                  320  
 Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser  
    325                                  330                                  335  
 Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu  
    340                                  345                                  350  
 Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu  
    355                                  360                                  365  
 Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile  
    370                                  375                                  380  
 Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala  
 385                                  390                                  395                                  400  
 Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala  
    405                                  410                                  415  
 Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val  
    420                                  425                                  430



Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Leu Pro Pro His  
                   435                                  440                                  445  
 Lys Gln Met Pro Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser  
                   450                                  455                                  460  
 Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser  
 465                                  470                                  475                                  480  
 Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu  
                                   485                                  490                                  495  
 Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg  
                                   500                                  505                                  510  
 Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe  
                                   515                                  520                                  525  
 Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg  
                   530                                  535                                  540  
 < 2 1 0 >     3  
 < 2 1 1 >     16  
 < 2 1 2 >     DNA  
 < 2 1 3 >     Artificial sequence  
 < 2 2 0 >  
 < 2 2 1 >  
 < 2 2 2 >  
 < 2 2 3 >     MseI adaptor  
 < 4 0 0 >     3  
 gacgatgagt cctgag  
                   < 2 1 0 >     4  
                   < 2 1 1 >     14  
                   < 2 1 2 >     DNA



< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI adaptor

< 4 0 0 > 4

tactcaggac tcat

14

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 20

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > TIR primer

< 4 0 0 > 5

tgtgcatttt tctttagtg

20

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 16

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI primer

< 4 0 0 > 6

gatgagtcct gagtaa

16





< 2 1 0 > 7  
< 2 1 1 > 19  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >  
< 2 2 3 > TIR+N primer  
< 4 0 0 > 7

tgtgcatttt tcttgtagn

19

< 2 1 0 > 8  
< 2 1 1 > 17  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >  
< 2 2 3 > Msel+N primer  
< 4 0 0 > 8

gatgagtcct gagtaan

17

< 2 1 0 > 9  
< 2 1 1 > 130  
< 2 1 2 > DNA  
< 2 1 3 > Artificial sequence  
< 2 2 0 >  
< 2 2 1 >  
< 2 2 2 >



&lt; 2 2 3 &gt;

&lt; 4 0 0 &gt; 9

tgagcatTTT tcttgtagtG ctgagatTTT cctccatttg tctgaagctc ttcaccttc 60

aacactaccc ccacatctca cctttcaagg tccaatcttt atcattcatc tttactcagg 120

actcatcgtc 130

&lt; 2 1 0 &gt; 10

&lt; 2 1 1 &gt; 26

&lt; 2 1 2 &gt; DNA

&lt; 2 1 3 &gt; Artificial sequence

&lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 1 &gt;

&lt; 2 2 2 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt; PR-5 primer

&lt; 4 0 0 &gt; 10

gggatccaac aaaaatggct gtcggg 26

&lt; 2 1 0 &gt; 11

&lt; 2 1 1 &gt; 29

&lt; 2 1 2 &gt; DNA

&lt; 2 1 3 &gt; Artificial sequence

&lt; 2 2 0 &gt;

&lt; 2 2 1 &gt;

&lt; 2 2 2 &gt;

&lt; 2 2 3 &gt; PR-3 primer

&lt; 4 0 0 &gt; 11

gggtcgacta agcatcaaaa catagagcc 29

&lt; 2 1 0 &gt; 12

&lt; 2 1 1 &gt; 22



< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > CBSC1-linker

< 4 0 0 > 12

cgatagatct gggggtcgac at

22

< 2 1 0 > 13

< 2 1 1 > 22

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > CBSC2-linker

< 4 0 0 > 13

cgatgtcgac ccccatatct at

22

< 2 1 0 > 14

< 2 1 1 > 2423

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Petunia hybrida

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein  
having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 14

attgcgcttc gtattttact gctgaatgaa atcgtgtttt tttattcagt tcgttggtat 60

taatttcaga gtttttttta ttaaagggtgt gtttggttga agaaattgta tttgctgaat 120



tttcagaag tttttgagtt ttgtctaac tattgtgaga tctgattttg aatttttcca	180
gtggtgtttt aagctcaatt cgacgtcggt ttactggaa ttctgatcag taaatagggc	240
tattttgatg taaggttgtg aaagtttaca gtttggaagt tgagttagtg aaaaagggga	300
aactttattg tgatattttc acaagtattt ggtgaattca ggttattgag a atg gct	357
Met Ala	
ttt gat ttt ggg acg ttg ttg gga aat gta gac agg tta tcg aca tct	405
Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Asn Val Asp Arg Leu Ser Thr Ser	
5 10 15	
gat cat caa tca gtt gtg tcg ata aac tta ttc gtt gct ctt att tgc	453
Asp His Gln Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu Ile Cys	
20 25 30	
gcg tgt att gtg atc ggt cat ttg ttg gaa gaa aac aga tgg atg aat	501
Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn	
35 40 45 50	
gag tcc ata act gcc tta gtg att ggt tct tgt act gga atc gtt att	549
Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Ile Val Ile	
55 60 65	
cta ctg ata agt gga gga aag aac tct cat att tta gtg ttc agt gaa	597
Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe Ser Glu	
70 75 80	
gat ctt ttc ttc att tac ctt ctt ccg cca atc att ttt aat gct ggg	645
Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly	
85 90 95	
ttc cag gtg aaa aag aaa tcg ttc ttc cgc aat ttc agc act atc atg	693
Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr Ile Met	
100 105 110	





ctc ttt ggg gca ctt ggc acc ttg ata tca ttc att att ata tca tta	741
Leu Phe Gly Ala Leu Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile Ser Leu	
115                      120                      125                      130	
ggt gcc att ggc att ttc aag aaa atg aat att gga agc ctt gaa att	789
Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asn Ile Gly Ser Leu Glu Ile	
135                      140                      145	
gga gat tac ctt gca att ggg gca atc ttc tct gct aca gat tct gta	837
Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser Val	
150                      155                      160	
tgc acc tta caa gtg ctt aat cag gat gaa aca ccc tta ttg tac agt	885
Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser	
165                      170                      175	
cta gtt ttt ggg gaa ggt gtt gtg aat gat gcc aca tct gta gtt ctg	933
Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu	
180                      185                      190	
ttc aat gct atc cag aac ttt gac tta tct cac atc gac acg ggc aaa	981
Phe Asn Ala Ile Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Asp Thr Gly Lys	
195                      200                      205                      210	
gct atg gaa tta gtt gga aac ttt cta tac ttg ttt gcc tca agc act	1029
Ala Met Glu Leu Val Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser Ser Thr	
215                      220                      225	
gcc cta gga gtt gct gct ggc cta ctg agc gcc tat att att aaa aaa	1077
Ala Leu Gly Val Ala Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys Lys	
230                      235                      240	
ctc tac ttt gga agg cac tca act gac cgt gag gtt gct ata atg ata	1125
Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile Met Ile	
245                      250                      255	



ctc atg gct tac cta tct tac atg ctt gct gaa tta ttc tat tta agt	1173
Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr Leu Ser	
260 265 270	
gca atc ctc act gtg ttt ttc tct ggg atc gtg atg tct cac tac acc	1221
Ala Ile Leu Thr Val Phe Phe Ser Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr	
275 280 285 290	
tgg cat aat gtg act gag agc tcg aga gtc act acc aag cac act ttt	1269
Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Thr Phe	
295 300 305	
gct aca tta tca ttt att gct gaa ata ttc ata ttc ctt tat gtt ggt	1317
Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr Val Gly	
310 315 320	
atg gat gct ttg gac att gag aag tgg aag ttt gta agc gac agc cct	1365
Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp Ser Pro	
325 330 335	
gga ata tca gtt cag gtt agc tca ata ttg ctg ggt ctt gtt ttg gtt	1413
Gly Ile Ser Val Gln Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu Val	
340 345 350	
gga aga gca gca ttt gtt ttc cca ttg tca ttc ttg tcc aac ttg acc	1461
Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Thr	
355 360 365 370	
aag aaa act cca gag gcg aaa att agt ttt aac cag cag gtt aca ata	1509
Lys Lys Thr Pro Glu Ala Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val Thr Ile	
375 380 385	
tgg tgg gct gga ctt atg aga ggt gcc gtt tct atg gcc ctt gct tat	1557
Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr	
390 395 400	



aat cag ttt acc agg gga ggt cat act cag tta cgc gca aat gca ata 1605  
 Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn Ala Ile  
 405 410 415  
 atg atc aca agt act atc act gtt gtc ctt ttc agc aca gtc gtg ttt 1653  
 Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe  
 420 425 430  
 ggg ttg atg aca aaa cct ttg att aga ata ttg cta ccc tca cac aaa 1701  
 Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Ile Leu Leu Pro Ser His Lys  
 435 440 445 450  
 cac ttg agc aga atg atc tct tct gaa cca acg acc cca aaa tcc ttc 1749  
 His Leu Ser Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Thr Thr Pro Lys Ser Phe  
 455 460 465  
 att gtg cca ctt ctt gac agc aca caa gac tca gaa gct gat ctg gaa 1797  
 Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp Leu Glu  
 470 475 480  
 cgc cat gta ccc cgt ccc cac agt ttg cgg atg ctc ctt tca acc cca 1845  
 Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser Thr Pro  
 485 490 495  
 tct cat aca gtg cat tat tac tgg aga aag ttt gac aat gca ttc atg 1893  
 Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met  
 500 505 510  
 cgt cca gtt ttc ggt gga cga ggt ttt gta cct ttt gct cca gga tca 1941  
 Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ala Pro Gly Ser  
 515 520 525 530  
 ccg aca gac cca gtt ggt gga aat ttg caa tgatggagat acagattgca 1991  
 Pro Thr Asp Pro Val Gly Gly Asn Leu Gln  
 535 540



aaaagtggtc ttggtgaggg aagagggcag ttttttggtg atgaggttcc gttttcttta 2051  
 atgttaatag caagtgtggt taaaaagggg ttgtctagtt tataggtttt gcagatctca 2111  
 agtatattca ttggggtgat catgttttca gctcagttat tgcttttggt cattgctgac 2171  
 catcaatttc tgtggggaat tcctataggt tttctcccta acagttcttt tcttcatttt 2231  
 ttgcaatttt atcgaaacac caaatgggtg tatattctgt aagcttgtgg catagctagc 2291  
 ttaattgtct tgtaaaattt cctacaggtt agagattggt tcttgatatg tagatttcat 2351  
 atgattgtaa cattcccatt tctcagaaaa gaaactataa tataaaattt ctggtggctg 2411  
 tcgcccgtgc tc 2423

< 2 1 0 > 15

< 2 1 1 > 540

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > *Petunia hybrida*

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an  
activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 15

Met Ala Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Asn Val Asp Arg Leu Ser

5

10

15

Thr Ser Asp His Gln Ser Val Val Ser Ile Asn Leu Phe Val Ala Leu

20

25

30

Ile Cys Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp

35

40

45

Met Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Ile

50

55

60

Val Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe

65

70

75

80

Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn

85

90

95





Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr  
 100 105 110  
 Ile Met Leu Phe Gly Ala Leu Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile  
 115 120 125  
 Ser Leu Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asn Ile Gly Ser Leu  
 130 135 140  
 Glu Ile Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu  
 165 170 175  
 Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val  
 180 185 190  
 Val Leu Phe Asn Ala Ile Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Asp Thr  
 195 200 205  
 Gly Lys Ala Met Glu Leu Val Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser  
 210 215 220  
 Ser Thr Ala Leu Gly Val Ala Ala Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile  
 245 250 255  
 Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr  
 260 265 270  
 Leu Ser Ala Ile Leu Thr Val Phe Phe Ser Gly Ile Val Met Ser His  
 275 280 285  
 Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His  
 290 295 300



Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr  
 305                      310                      315                      320  
 Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp  
                          325                      330                      335  
 Ser Pro Gly Ile Ser Val Gln Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val  
                          340                      345                      350  
 Leu Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn  
                          355                      360                      365  
 Leu Thr Lys Lys Thr Pro Glu Ala Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val  
                          370                      375                      380  
 Thr Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn  
                          405                      410                      415  
 Ala Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val  
                          420                      425                      430  
 Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Arg Ile Leu Leu Pro Ser  
                          435                      440                      445  
 His Lys His Leu Ser Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Thr Thr Pro Lys  
                          450                      455                      460  
 Ser Phe Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp  
 465                      470                      475                      480  
 Leu Glu Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser  
                          485                      490                      495  
 Thr Pro Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala  
                          500                      505                      510



Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Ala Pro

515

520

525

Gly Ser Pro Thr Asp Pro Val Gly Gly Asn Leu Gln

530

535

540

< 2 1 0 > 16

< 2 1 1 > 2553

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Nierembergia hybrida

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein  
having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 16

aattattatt atttctctcc aactctcatt tctcagtttg ttgtgacttt ttcagagctt 60  
gaagttcagt taattcattt tccaatatat tgattgtttt catttgagcg cgagaggatt 120  
tcgtcttctc aatctgcttt caaatccttt ttgtttgtga tattcgatat tattcactca 180  
gtttacctta atatttctc gcactttctg aattcgagtg ctttgaagtg tgttgagattt 240  
cgaaaagcgg aagaaaattc agcaaaaacg ctgttgctga atttgcagca gtttgagttt 300  
ttgctaaata gctaagatct gattgaattt ttcactgggtg cttataggga aattcgacgt 360  
cgttttgact gcaatatttg tccgtgattc ggactttgtt gaaattttgc tatttgaaat 420  
ttgaatgtaa ggttgtcata gctttgccac tcggaaatac agtcagttag aaagaaaaaa 480  
aactgtgtag tgttttttcc acaagtattt ggtgaattga ggttcttgaa atg gcg 536

Met Ala

ttt gac ttt ggg act ctg ctg gga aag atg aac aac tta aca act tct 584

Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Lys Met Asn Asn Leu Thr Thr Ser

5

10

15

gat cat caa tca gtg gtg tcg gta aac ttg ttt gtt gca ctt att tgc 632

Asp His Gln Ser Val Val Ser Val Asn Leu Phe Val Ala Leu Ile Cys

20

25

30



gcg tgt att gtg atc ggt cat tta ttg gag gaa aac aga tgg atg aat	680
Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn	
35                                      40                                      45                                      50	
gag tcc ata act gcc ctt gtg att ggt agt tgc act gga gtc atc att	728
Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Val Ile Ile	
55                                      60                                      65	
cta cta ata agt gga gga aag aac tca cat att tta gtg ttc agc gaa	776
Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe Ser Glu	
70                                      75                                      80	
gat ctt ttc ttc att tac ctt ctt cca ccg atc att ttt aat gct ggg	824
Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly	
85                                      90                                      95	
ttc cag gtg aaa aag aaa tca ttc ttc cgc aat ttc agt act atc atg	872
Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr Ile Met	
100                                      105                                      110	
ctc ttt ggg gca gtt ggc acc ttg ata tcg ttc att att ata tca gcg	920
Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile Ser Ala	
115                                      120                                      125                                      130	
ggt gct att ggc att ttc aag aaa atg gat att gga cac ctt gaa att	968
Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asp Ile Gly His Leu Glu Ile	
135                                      140                                      145	
gga gat tac ctt gca att gga gca atc ttt gct gca aca gat tct gta	1016
Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Val	
150                                      155                                      160	
tgc acc tta caa gtg ctt aat cag gaa gaa aca ccg tta ttg tac agt	1064
Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Glu Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser	
165                                      170                                      175	





cta gtg ttt gga gaa ggt gtt gtg aat gat gcc aca tct gta gtg ctg	1112
Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu	
180 185 190	
ttc aat gct gtc cag aac ttt gac tta tct cat atc agc aca ggc aaa	1160
Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Ser Thr Gly Lys	
195 200 205 210	
gct ctg caa tta att gga aac ttt cta tac ttg ttt gcc tcg agc act	1208
Ala Leu Gln Leu Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser Ser Thr	
215 220 225	
ttc cta ggg gtt gct gtt ggc cta cta agt gcc ttt ata att aag aaa	1256
Phe Leu Gly Val Ala Val Gly Leu Leu Ser Ala Phe Ile Ile Lys Lys	
230 235 240	
ctc tac ttt gga agg cac tcg act gat cgt gag gtt gct ata atg ata	1304
Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile Met Ile	
245 250 255	
ctc atg gcg tac cta tca tac atg ctt gct gaa tta ttc tat tta agt	1352
Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr Leu Ser	
260 265 270	
gga atc ctc act gtg ttt ttc tgt ggg atc gtg atg tct cac tat acc	1400
Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr	
275 280 285 290	
tgg cat aat gtg act gag agc tca aga gtc act acc aag cac acg ttt	1448
Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His Thr Phe	
295 300 305	
gct aca tta tca ttt att gct gaa ata ttc ata ttc ctt tat gtt ggt	1496
Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr Val Gly	
310 315 320	



atg gat gct ttg gac att gag aag tgg aag ttt gta agc gac agc ccc	1544
Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp Ser Pro	
325 330 335	
gga aca tca att aag gtc agc tca att ctg cta ggt ctt gtt ttg gtt	1592
Gly Thr Ser Ile Lys Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val Leu Val	
340 345 350	
gga agg gga gcc ttt gtt ttc ccc ttg tca ttc ttg tcc aac ttg acc	1640
Gly Arg Gly Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Thr	
355 360 365 370	
aag aaa aat cct gag gac aag att agc ttt aac cag cag gtt aca ata	1688
Lys Lys Asn Pro Glu Asp Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val Thr Ile	
375 380 385	
tgg tgg gct ggg ctt atg cga ggt gct gtt tct atg gcc ctt gct tat	1736
Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr	
390 395 400	
aat cag ttt acc agg gga ggt cat act cag tta cgt gcc aat gca ata	1784
Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn Ala Ile	
405 410 415	
atg atc acg agt act atc act gtt gtc ctt ttc agc aca gtg gta ttt	1832
Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe	
420 425 430	
ggg ttg atg aca aaa cct tta att cta tta ttg cta ccc tca caa aaa	1880
Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Leu Leu Leu Leu Pro Ser Gln Lys	
435 440 445 450	
cac ttg atc aga atg atc tcc tct gaa ccg atg act cca aaa tcc ttc	1928
His Leu Ile Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Met Thr Pro Lys Ser Phe	
455 460 465	



att gtg cca ctt ctt gac agc aca caa gac tca gaa gct gat ctg ggc 1976  
 Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp Leu Gly  
 470 475 480  
 cga cat gta ccc cgt ccc cac agt ttg cgg atg ctc ctg tca acc cca 2024  
 Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser Thr Pro  
 485 490 495  
 tct cac acg gta cat tac tac tgg aga aaa ttt gac aat gca ttc atg 2072  
 Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met  
 500 505 510  
 cgt cct gtt ttc ggt gga cga ggt ttt gta cct ttt gtt cca gga tca 2120  
 Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Val Pro Gly Ser  
 515 520 525 530  
 cct act gaa ccg gtc gaa ccg acc gaa cca aga cca gcc gaa tca aga 2168  
 Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Thr Glu Pro Arg Pro Ala Glu Ser Arg  
 535 540 545  
 cca acc gaa cca act gat gag tgattacact gatggagatg caggttgcaac 2219  
 Pro Thr Glu Pro Thr Asp Glu  
 550  
 taaagtccca ctggccttgg agaaggacga aggcagtttt ttgggtttga ggttttgttt 2279  
 actgttaata gttttcgaat gtggttaaaa aagggttgct tagtttttat atataggtcg 2339  
 cagatacgta atttcagctc agttcccgag gtgaaccct tagaggtttt cttcctgacg 2399  
 gtttttcttc ttttttgtaa tttatcaaaa acaccaaag ggtgtatatt ctttaagctt 2459  
 gtagcttaat taccttataa gcatgtgga gcgttcgtgt aatatgtaaa atttccattg 2519  
 ccagaaaaga aacttccata caatatttct gccg 2553  
 < 2 1 0 > 17  
 < 2 1 1 > 553  
 < 2 1 2 > PRT



< 2 1 3 > Nierembergia hybrida

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an  
activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 17

Met Ala Phe Asp Phe Gly Thr Leu Leu Gly Lys Met Asn Asn Leu Thr

5

10

15

Thr Ser Asp His Gln Ser Val Val Ser Val Asn Leu Phe Val Ala Leu

20

25

30

Ile Cys Ala Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp

35

40

45

Met Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Val Ile Gly Ser Cys Thr Gly Val

50

55

60

Ile Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Asn Ser His Ile Leu Val Phe

65

70

75

80

Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn

85

90

95

Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ser Thr

100

105

110

Ile Met Leu Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile

115

120

125

Ser Ala Gly Ala Ile Gly Ile Phe Lys Lys Met Asp Ile Gly His Leu

130

135

140

Glu Ile Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp

145

150

155

160

Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Asn Gln Glu Glu Thr Pro Leu Leu

165

170

175





Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val  
180 185 190

Val Leu Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Ser His Ile Ser Thr  
195 200 205

Gly Lys Ala Leu Gln Leu Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Ala Ser  
210 215 220

Ser Thr Phe Leu Gly Val Ala Val Gly Leu Leu Ser Ala Phe Ile Ile  
225 230 235 240

Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile  
245 250 255

Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Tyr  
260 265 270

Leu Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His  
275 280 285

Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Lys His  
290 295 300

Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Ile Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr  
305 310 315 320

Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Ser Asp  
325 330 335

Ser Pro Gly Thr Ser Ile Lys Val Ser Ser Ile Leu Leu Gly Leu Val  
340 345 350

Leu Val Gly Arg Gly Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn  
355 360 365

Leu Thr Lys Lys Asn Pro Glu Asp Lys Ile Ser Phe Asn Gln Gln Val  
370 375 380



Thr Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu  
 385 390 395 400  
 Ala Tyr Asn Gln Phe Thr Arg Gly Gly His Thr Gln Leu Arg Ala Asn  
 405 410 415  
 Ala Ile Met Ile Thr Ser Thr Ile Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val  
 420 425 430  
 Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Leu Leu Leu Leu Pro Ser  
 435 440 445  
 Gln Lys His Leu Ile Arg Met Ile Ser Ser Glu Pro Met Thr Pro Lys  
 450 455 460  
 Ser Phe Ile Val Pro Leu Leu Asp Ser Thr Gln Asp Ser Glu Ala Asp  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Arg His Val Pro Arg Pro His Ser Leu Arg Met Leu Leu Ser  
 485 490 495  
 Thr Pro Ser His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala  
 500 505 510  
 Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Phe Val Pro  
 515 520 525  
 Gly Ser Pro Thr Glu Pro Val Glu Pro Thr Glu Pro Arg Pro Ala Glu  
 530 535 540  
 Ser Arg Pro Thr Glu Pro Thr Asp Glu  
 545 550

< 2 1 0 > 18

< 2 1 1 > 2361

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > *Torenia hybrida*

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein



having an activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 18

gttgagatt ccgagctgca gcatcacctt gcttatgtaa gctttaaag tatcagaatt 60  
 gaatatcgac cactggaaag tgttttagga ctggattct tatctattga gcttgittga 120  
 aggtgaaaaa aggtcgcac tcgttcctct atagttggtt ttctggagtt gcaagcgact 180  
 ctactcgaa tctctttccg ccttattgga agctctgctt tactaaaaaa agtttgtctt 240  
 tttatctctg attcatcata aaatctgcgg gagattcaga agcggagatc tgggtcccag 300  
 agcaggagtt tcaactttga gcccgtttat attataaac aaattccgag tccaaagatt 360  
 gaactttgaa ataatcaaat aatcaagcaa gcaat atg ggg ttt gaa tct gta 413

Met Gly Phe Glu Ser Val

5

att aag cta gcg gca agt gaa act gac aat ttg tgg agc tct ggt cac 461  
 Ile Lys Leu Ala Ala Ser Glu Thr Asp Asn Leu Trp Ser Ser Gly His

10

15

20

ggt tca gtg gtc gct ata acc tta ttt gtc act ctt ctc tgc aca tgt 509  
 Gly Ser Val Val Ala Ile Thr Leu Phe Val Thr Leu Leu Cys Thr Cys

25

30

35

ata gtg att ggt cat ctt ctg gag gaa aac cgt tgg atg aat gaa tct 557  
 Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Met Asn Glu Ser

40

45

50

atc att gcc ctc ata att ggt tta gcc acg gga gtt ata atc ctg tta 605  
 Ile Ile Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ala Thr Gly Val Ile Ile Leu Leu

55

60

65

70

ata agt ggt gga aaa agc tcc cat ctc ttg gtg ttc agt gag gat ctt 653  
 Ile Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser Glu Asp Leu

75

80

85



ttc ttc atc tat gcg ctg cca cca atc att ttt aat gcg ggg ttc caa	701
Phe Phe Ile Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala Gly Phe Gln	
90 95 100	
gta aaa aag aaa tca ttc ttt cgc aat ttc gca act ata atg atg ttt	749
Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe Ala Thr Ile Met Met Phe	
105 110 115	
gga gca gtt ggt acc ttg ata tcc ttc atc atc att tca ctc ggt aca	797
Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile Ile Ile Ser Leu Gly Thr	
120 125 130	
att gca ttc ttc ccc aaa atg aac atg aga ctt gga gtt gga gat tat	845
Ile Ala Phe Phe Pro Lys Met Asn Met Arg Leu Gly Val Gly Asp Tyr	
135 140 145 150	
ctt gct att gga gct att ttt gct gca aca gac tca gtt tgc aca tta	893
Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Val Cys Thr Leu	
155 160 165	
cag gtg cta agc cag gac gaa aca cca ctg ttg tac agt cta gtg ttt	941
Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr Ser Leu Val Phe	
170 175 180	
ggc gag ggt gtt gta aat gac gcg act tca gtg gtc cta ttt aat gca	989
Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val Leu Phe Asn Ala	
185 190 195	
gta cag aac ttc gac ctg cct cat atg tct act gct aaa gct ttc gag	1037
Val Gln Asn Phe Asp Leu Pro His Met Ser Thr Ala Lys Ala Phe Glu	
200 205 210	
ctt gtt gga aac ttc ttt tat tta ttt gct aca agc act gtg ctg ggt	1085
Leu Val Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Ala Thr Ser Thr Val Leu Gly	
215 220 225 230	





gtt ctg act gga ttg ctt agt gca tac atc ata aaa aag ctc tat ttt	1133
Val Leu Thr Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile Ile Lys Lys Leu Tyr Phe	
235 240 245	
gga agg cac tcc act gat cgc gag gtt gcc ata atg ata ctc atg gct	1181
Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Ile Met Ile Leu Met Ala	
250 255 260	
tat ctg tcg tat atg tta gct gaa tta ttc gat ttg agc ggt atc ctc	1229
Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe Asp Leu Ser Gly Ile Leu	
265 270 275	
acc gtg ttc ttc tgt gga att gtg atg tcg cac tat aca tgg cac aat	1277
Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr Thr Trp His Asn	
280 285 290	
gtc act gaa aac tca aga gtt acc acc aag cat aca ttt gcg aca ttg	1325
Val Thr Glu Asn Ser Arg Val Thr Thr Lys His Thr Phe Ala Thr Leu	
295 300 305 310	
tca ttt gtt gct gaa ata ttt ata ttt ctg tat gtt ggc atg gat gct	1373
Ser Phe Val Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu Tyr Val Gly Met Asp Ala	
315 320 325	
tta gac att gag aaa tgg aga ttc gta agc ggc agc atg aca aca tct	1421
Leu Asp Ile Glu Lys Trp Arg Phe Val Ser Gly Ser Met Thr Thr Ser	
330 335 340	
gca gct gtc agt gca act ctg ctg gga ttg gtt ttg ctc tca aga gca	1469
Ala Ala Val Ser Ala Thr Leu Leu Gly Leu Val Leu Leu Ser Arg Ala	
345 350 355	
gcc ttt gta ttc cct tta tca ttt ctc tcc aat ctg gcc aaa aag tcc	1517
Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu Ala Lys Lys Ser	
360 365 370	



cca ctc gaa aaa atc agt ctc agg cag caa att ata ata tgg tgg gct	1565
Pro Leu Glu Lys Ile Ser Leu Arg Gln Gln Ile Ile Ile Trp Trp Ala	
375                      380                      385                      390	
ggt ctt atg cgc gga gcc gtt tcc atg gct ctt gct tac aag cag ttt	1613
Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala Leu Ala Tyr Lys Gln Phe	
395                      400                      405	
act aga gaa ggt ctc aca gtg gaa cgt gaa aat gcc ata ttc atc acc	1661
Thr Arg Glu Gly Leu Thr Val Glu Arg Glu Asn Ala Ile Phe Ile Thr	
410                      415                      420	
agt aca atc acc att gtg ctc ttc agc act gtg gtg ttt ggt ttg atg	1709
Ser Thr Ile Thr Ile Val Leu Phe Ser Thr Val Val Phe Gly Leu Met	
425                      430                      435	
acg aag ccc ctc atc aat tta ctg ata ccc tca cca aag ctt aac aga	1757
Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Ile Pro Ser Pro Lys Leu Asn Arg	
440                      445                      450	
tcg gtc tct tca gaa ccg ctg act cca aac tcc atc aca atc cca ctt	1805
Ser Val Ser Ser Glu Pro Leu Thr Pro Asn Ser Ile Thr Ile Pro Leu	
455                      460                      465                      470	
ctc ggg gaa agt cag gac tct gtg gcc gaa cta ttc agc atc aga ggt	1853
Leu Gly Glu Ser Gln Asp Ser Val Ala Glu Leu Phe Ser Ile Arg Gly	
475                      480                      485	
caa act tca caa ggt ggc gaa ccc gtt gct cga ccg agc agc cta cgc	1901
Gln Thr Ser Gln Gly Gly Glu Pro Val Ala Arg Pro Ser Ser Leu Arg	
490                      495                      500	
atg tta ctc aca aag ccc act cat acg gtg cac tat tat tgg aga aaa	1949
Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His Thr Val His Tyr Tyr Trp Arg Lys	
505                      510                      515	



ttc gac aat gct ttt atg cgt ccg gtc ttt ggt ggg cgt ggc ttt gta 1997

Phe Asp Asn Ala Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe Val

520

525

530

cca tat gtt ccc ggt tca ccg act gaa cga agc gtt cgc aac tgg gaa 2045

Pro Tyr Val Pro Gly Ser Pro Thr Glu Arg Ser Val Arg Asn Trp Glu

535

540

545

550

gaa gag acc aaa cag taaaaagatt ttcttgtgtg aatgatggtg aagagattag 2100

Glu Glu Thr Lys Gln

555

attctttgga tattcggtttt tcttatttct aatgtgtcac ctgggaagtt gttgaatgaa 2160

attatattat cgtctgggtt tgcactttgc gcttgtggaa ggaatatttc ttctggattt 2220

tgcatggaaa cctcaatgat aggggggtgtg atatttttgt tagaaactga gtcgtttgat 2280

gtatattgtt ggtaatgcag ctgggttttg ttttgtatgt atagtcatca agtgtgtatt 2340

tattcatatt gttatgcagt c 2361

< 2 1 0 > 19

< 2 1 1 > 555

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Torenia hybrida

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an  
activity to control pH in vacuoles

< 4 0 0 > 19

Met Gly Phe Glu Ser Val Ile Lys Leu Ala Ala Ser Glu Thr Asp Asn

5

10

15

Leu Trp Ser Ser Gly His Gly Ser Val Val Ala Ile Thr Leu Phe Val

20

25

30

Thr Leu Leu Cys Thr Cys Ile Val Ile Gly His Leu Leu Glu Glu Asn

35

40

45



Arg Trp Met Asn Glu Ser Ile Ile Ala Leu Ile Ile Gly Leu Ala Thr  
 50 55 60  
 Gly Val Ile Ile Leu Leu Ile Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Val Phe Ser Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Ala Leu Pro Pro Ile Ile  
 85 90 95  
 Phe Asn Ala Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Ser Phe Phe Arg Asn Phe  
 100 105 110  
 Ala Thr Ile Met Met Phe Gly Ala Val Gly Thr Leu Ile Ser Phe Ile  
 115 120 125  
 Ile Ile Ser Leu Gly Thr Ile Ala Phe Phe Pro Lys Met Asn Met Arg  
 130 135 140  
 Leu Gly Val Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser  
 180 185 190  
 Val Val Leu Phe Asn Ala Val Gln Asn Phe Asp Leu Pro His Met Ser  
 195 200 205  
 Thr Ala Lys Ala Phe Glu Leu Val Gly Asn Phe Phe Tyr Leu Phe Ala  
 210 215 220  
 Thr Ser Thr Val Leu Gly Val Leu Thr Gly Leu Leu Ser Ala Tyr Ile  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala  
 245 250 255





Ile Met Ile Leu Met Ala Tyr Leu Ser Tyr Met Leu Ala Glu Leu Phe  
260 265 270  
Asp Leu Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser  
275 280 285  
His Tyr Thr Trp His Asn Val Thr Glu Asn Ser Arg Val Thr Thr Lys  
290 295 300  
His Thr Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Ile Phe Ile Phe Leu  
305 310 315 320  
Tyr Val Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Arg Phe Val Ser  
325 330 335  
Gly Ser Met Thr Thr Ser Ala Ala Val Ser Ala Thr Leu Leu Gly Leu  
340 345 350  
Val Leu Leu Ser Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser  
355 360 365  
Asn Leu Ala Lys Lys Ser Pro Leu Glu Lys Ile Ser Leu Arg Gln Gln  
370 375 380  
Ile Ile Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Met Ala  
385 390 395 400  
Leu Ala Tyr Lys Gln Phe Thr Arg Glu Gly Leu Thr Val Glu Arg Glu  
405 410 415  
Asn Ala Ile Phe Ile Thr Ser Thr Ile Thr Ile Val Leu Phe Ser Thr  
420 425 430  
Val Val Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Ile Pro  
435 440 445  
Ser Pro Lys Leu Asn Arg Ser Val Ser Ser Glu Pro Leu Thr Pro Asn  
450 455 460



Ser Ile Thr Ile Pro Leu Leu Gly Glu Ser Gln Asp Ser Val Ala Glu

465 470 475 480

Leu Phe Ser Ile Arg Gly Gln Thr Ser Gln Gly Gly Glu Pro Val Ala

485 490 495

Arg Pro Ser Ser Leu Arg Met Leu Leu Thr Lys Pro Thr His Thr Val

500 505 510

His Tyr Tyr Trp Arg Lys Phe Asp Asn Ala Phe Met Arg Pro Val Phe

515 520 525

Gly Gly Arg Gly Phe Val Pro Tyr Val Pro Gly Ser Pro Thr Glu Arg

530 535 540

Ser Val Arg Asn Trp Glu Glu Glu Thr Lys Gln

545 550 555

< 2 1 0 > 20

< 2 1 1 > 6298

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Ipomea nil

< 2 2 3 > Nucleotide sequence of promoter region of gene  
coding for protein having an activity to control  
pH in vacuoles

< 4 0 0 > 20

gatctcagtc tgtggatgtc ctagagacat tcatatttga agttgagagt tagctaaata 60

gaaaggtaaa gacaattgga tcatataaag gtgatgagta ttatgggaaa ccatcaaaag 120

ttgggcaaatt tcccggtcca ttttaagaaat tcctcgaatc taaaggcatt tgtgcataat 180

acacaatgtc aggcacacca caacaaaatg gtgtggaaga aaggtgaaat cgtactctaa 240

gggaaatggt taggagttag gtaaataatt gtacattgct tgtttcattg tggatatatg 300

cattaataaac aacagcatac ttactcaata gggttcctag taaggttgtt ttttaaaaca 360

ccttatgaac tgtggacaag aaggaaacct agtttgagac atcttcacat tcagggttgt 420



caagctggag tgatgatata taatccacat gaaaataaat tatggatatac cagaaccatt 480  
aatggttatt tcattggata tccagaaagg tctaaaggta catgtttatt gtcctaataca 540  
taagtacgag gattgttgag tctggtaatg ctgccttcac ttaaaatggc gaagtcagtg 600  
ggagtgtggg agctcgtaat gttaaaatta aggagtcatt gatggttcta gattcatcaa 660  
gtgatccttt tttcctgttg ttgttcctat tgttgcagtg cagtgtagcc ttatggaaat 720  
actttggaac aacagcaact agatgctcaa attccacatg aggaagctat tgtaaataaa 780  
gatgaggttg aaactcaaga tgatgatcaa gtgaaatctc agcaggaagt gacattaagg 840  
aggtctacta tagatagaaa agatcaacca ttcttgatga ctatattgtt tatacacttg 900  
agcattgata attatccagt ctcatTTAAC caagccatac aggataataa ttctccttga 960  
ggattatTTTt ggTTTTggTg gctcattctg ttcttgagct ccaccaaagTg gttgttaaaa 1020  
ttacctttct gaatggtaaa ttaaaagagg aagtatacat ggattagccg taaggcttca 1080  
tgGCCacagg aaaggaaaat ctggtatgta gattgaagat gtcgatctat ggattaaaac 1140  
atgcttctag acaatggtac ttgagattgt catttggttt tntagagatc actgttgatc 1200  
ggtgtatcca cataaaggTt taatggaagc aagtttTtaa tcctagtatt acatgttaac 1260  
gacattcttc ttgtctctaa taataaaagg gatgttgcgt gatgttaagg aatagctttc 1320  
taagaacttt gaaatgaagg atatgggtga gacttcatat gtgattggaa taagaaatat 1380  
tccgtaatag atcacatggg atTTtaggtt catcctagaa gactcacatt aacaaagttt 1440  
tagaaagata caaactggaa atctgcaaag agggTcctgt gatacttaca aggcactaag 1500  
gaccacatgc tcacctataa aatgaacgaa taacctagag gttataggTt attcggattc 1560  
agactatgcc ggatgtttgg ataccgaaa atccacattc gaataatTTt ttccacttgc 1620  
tcgtggagca atatcttgga tgagtgtgaa ggagcctgtc attgctactt ccactataag 1680  
ggcagaattt gtagcatgct ttgaggctag tagacactat aaaaattggc tgccttgtgc 1740  
caacatcatt tgcattccagc tataagcatc tccattttcg aacatcattc gattcttata 1800  
gctggatgaa gatgattcac tgcactttgg ttgcatattg aagctgcgat tgctatcgaa 1860  
aacaataaac ctatctatat aaaacaaacg acttagattt aggaataag aaggaagata 1920  
ctTTTTTTaa aatcccaaaa ttacctTTta ggTTtgacct gcaaataaca cTTtaagatc 1980  
aaatcagata aaatgtcata atcaatgatc aaattgaata attttagtag tcgaggatca 2040



aattggtaaa atccccatag tcgagggact aaaccagtaa tttctcgcg tttgaacgtt 2100  
tgtccgaaaa ttggcattag cgatagctta attgagtttt tcaattctct aattttttaa 2160  
attttgtttc ttcataaaat ccttcacttt ttcactttgc taatattttg ccgaatttat 2220  
aatatttcca atttctaaag tagcagaacc ccagacgttg aactgccaat tttttttttt 2280  
gtttttgttt tttgtttttt tatttcctta tccctccacc tcattttgaa gtttaattatt 2340  
attattaatt cattaatttt taaaatagag agactgcatt aacacaaaat tagccaatta 2400  
ggtagcagaa ttaaatttaa acaaacaagt tggtttaatg taatttttgt caatttaatt 2460  
tctctatttt tggacaaaaa ttaggtagac ttattaaatt aaataaacat gtttgtttaa 2520  
ttttacttct tctacctaag tttgtgtcaa ttcagtctct ctattttata aattaatgaa 2580  
tggttaaata taacttataa gtgcattgtg tccaaatgat cacaagagtt aggccaactt 2640  
cttttttcat ataggtgatt cttttttcga gtattacgta cacttcagtc ttgtcaacta 2700  
acacttagaa tttagtgtc attttcgaac ataggtgtca actaagtttg gtatccacta 2760  
tatagcacat gtattccaag agatttaatc tcattcatca tgacaacttc tctaccaatt 2820  
ctttgtcaa tcttttagtt agcgaattcg ctatattatc ctataacttt cagtatagtc 2880  
aacaaaaata aaatgtattg caagaaacta tttaatagtg tatgttatgt atatgtccta 2940  
tatgtctaga cttaccgtta tacatattac taatttacta tatgtccttc caattgcgaa 3000  
ttgactatcg taatgcatac atattggaga tatatatatt ttctaggggt aaatgcaggt 3060  
tggatcgacc cattaggcct gcccacgc aaactttttt tgtcgggctt ttgcggaccg 3120  
gcttgcggt tagaaaatac acagcccaag cccgtccatg cgggctcgcg ggccttattt 3180  
caaaaaaaaa aaaaatacta cgtattatc tattatttta tattcaaata gtctaata 3240  
aataaataaa aaaatcgtgt ttgaaaatta cttttttttt tatatatatt ttttaaaatt 3300  
ttaatgttat atacgaagtg tgtgtaatat atatatatat atatatatat atatatatat 3360  
atatatatat atatatatat attatttata ttatttata ttatgtttat atttaaatac 3420  
gggcatggct cgtcggctgg tccgttaggt ccgctctttt gtaggcatt ttttgtgtg 3480  
accctaaatc gtctaccgc gggacaagta tagggcagct tgcggacttc ggtccatttt 3540  
gacatatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata 3600  
tatatatata taacattaaa atttaaaaaa tatagatttt ttttaaacat gaaaaaaatt 3660





aatattatatt atattaaatt atttgaatat aaaataaata atactttttt atagcttgcg 3720  
ggctgggtcca taaaagcccg taaaaagaat acgttgggggt tggcctaata gaccgatcca 3780  
acccgcattg acacccatag gaaaaacatc tatctccaat ttgtatgcat tacaatagtc 3840  
aatttgcaat tggaagagca tatagtaatt agtaatatgt ataacggtaa gtctagacat 3900  
attgaacatg tacataatac tattaaatag cttcttgcaa taggttttat ttttgttgac 3960  
tatacatgaa gttataggat aatatagcga attcacaac taaaagattg agcaatgagt 4020  
tagtagaaaa gttgtcatga tggatgagat taaatctctt ggaatacatg tgctagtga 4080  
taccaaactt agctgacacc tatgttcgaa aatgacaact aaattctact acgtaagtgt 4140  
tagttgacaa agtagagtgt actgaatact cgaaaaaaga atcagttatg tgaaaaaaa 4200  
aagttggcct aactcttggt atcattttag acacaatgca cttataagtt atactagtat 4260  
tttttatgcg cgatgcacaa aaaatagttg cacaatatta atacattata ttaaaatatt 4320  
aaatttatatt agattttaga tatttaaatt gttctaacta ataatactaa taataataat 4380  
gtaaataatt ttataaatt tcagatttat atttaggtaa taattaacat ataactcaa 4440  
tatataatgt gtatatatta ttattaaggg aaaatgacac tttttttccc tgagttatat 4500  
accacttttt ttcccttgag ttatttaagt ggctcttttc cccctaaaat gttaaattga 4560  
catattaacc cttaaaataa atatttcaa taaatatttc atttatattt cttctctaac 4620  
aaattattac tataatttgg ttcaaacc aaacagatact tagcaacca accaaaatat 4680  
tccaattaca atttagaatc aaaacgcgat atttaaagtt tattaaaatt gcaaatcgga 4740  
atggtcggtt catgttccga actgaaaaaa taaaatacat ttattgttga atttagacta 4800  
ttttaaaata aaaaataaaa caaaatttta aaataaagac ggttcaaat cgcgaccga 4860  
atccggaacc gccggttcac ggttcatgat ccagtttttt tggttcataa aatttaataa 4920  
attgaaatct aatatattga ttctagatct gaatacatac cgaaaacttt taattcgatt 4980  
actatagtgt ccggttcagt tcgaaccgaa ccgtgggtcat tgctacatat acacaataat 5040  
ttgttgaga aattaaataa ataaaatgtt tactttaagg gtagaaatgt caatttaata 5100  
tttcgggggg aaaaccacca cttttaaatt aattgagggg gctaattgtc ttatataaat 5160  
ataattgagg ggaaaaagt gtataagtat ataacttagg gggaaaaaat gtcattttcc 5220  
ctattattaa tgaagaagat aagaaaatat atggatgaat catgtgcctt tatagcataa 5280



tgtacaaaa aaacttaacg aaaaaaacia acataaataa ggggtataac tticattcac 5340  
acttattatg tttttagatt agatttaacc atacatgcat taatttgtaa aatagcgaga 5400  
gtgaattaac acaaaattag gtagaagaag taaaattaaa caaacatgtt tatttaattt 5460  
aacaagtcca cctaattttt gtccaaaaat agagaaatta aattgacaaa aattacatta 5520  
aacaacttg tttgttttaa ttgaattcct ctacctaatt ggctaatttt gtgttaatgc 5580  
agtctctcta ttttaaaaat taatgaatta ataataataa ttaacttcaa aatgaggtgg 5640  
agggataagg aaataaaaaa acaaaaaaca aaaacaaaaa aaaaaaattg gcagttcaac 5700  
gtctgggggt ctgctacttt aaatactgat aggagagttg tcgttcattt tacaagtatt 5760  
aaggatgtac acgtattgag aatgtaggct acagaaattt tcagacagat agatacataa 5820  
atccgtataa tagagacaga gaaacagaaa aagagagagt cacgttaatc ctgagatttt 5880  
cctccatttg tctgaagctc ttcatccttc aacactacce ccacatctca ctttcaagg 5940  
tccaatcttt atcattcatc ttttaatttc agctctatct tgggatttgc atgtaaattt 6000  
tatttatattt tcgggtttct gtttccgac ttatgctttt gttccaaagg gtatttgatt 6060  
tcatatatta tgagttttgc atgcattttc tcttttgtaa aatgaaagaa aatttgagat 6120  
attggtgggt ttgatctgaa agtttgtttg tttgcagtga tttgtatgtt ttcgggaggg 6180  
attggaatgg gcaaccgga tatgtgaaca gaaaccacga cattgggaaa agatttattg 6240  
caaaaattgt tttgattgtt ttggattttg tggtagaaaa aggggaagaa caaaaatg 6298



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
GenBank/EMBL/DBJ/Geneseq, PIR/Swissprot

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.) 27.10月.1994 (27.10.94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A	1, 7-14
A	Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger gene in <i>Oryza sativa</i> " Biochim. Biophys. Acta (1999, Jul.) 第1446巻 p. 149-155	1-14
A	Gaxiola, A. R. et al. "The <i>Arabidopsis thaliana</i> proton transporters, AtNhxl and Avpl, can function in cation detoxification in yeast" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999, Feb.) 第96巻	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	p. 1480-1485	
A	Lu, P. Y. et al. "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 第94巻 p. 8243-8248	1-14
A	Marrs, A. K. et al. "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995) 第375巻 第6530号 p. 397-400	1-14
T	Tanaka, S. et al. "Colour-enhancing protein in blue petals" Nature (2000, Oct.) 第407巻 p. 581	1-14

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ISHIDA, Takashi  
A. Aoki, Ishida & Associates  
Toranomon 37 Mori Building  
5-1, Toranomon 3-chome  
Minato-ku  
Tokyo 105-8423  
JAPON

15

Date of mailing (day/month/year) 01 March 2001 (01.03.01)		
Applicant's or agent's file reference H794-PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/05722	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	
Priority date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)		
Applicant SUNTORY LIMITED et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,EP,JP,NZ

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 01 March 2001 (01.03.01) under No. WO 01/14560

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.


The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38





## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24. 08. 2000) 木曜日 17時03分11秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01. 07. 2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	H794-PCT
I	発明の名称	液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	サントリー株式会社
II-4ja	名称	SUNTORY LIMITED
II-4en	Name	530-8203 日本国
II-5ja	あて名:	大阪府 大阪市北区
II-5en	Address:	堂島浜 2丁目1番40号 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-I	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-I-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-I-2	右の指定国についての出願人である。	飯田 滋
III-I-4ja	氏名(姓名)	IIDA, Shigeru
III-I-4en	Name (LAST, First)	444-0874 日本国
III-I-5ja	あて名:	愛知県 岡崎市
III-I-5en	Address:	竜美南 2-4-1-3-21 2-4-1-3-21, Tatsumi-minami, Okazaki-shi, Aichi 444-0874 Japan
III-I-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-I-7	住所 (国名)	日本国 JP



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24. 08. 2000) 木曜日 17時03分11秒

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja 氏名(姓名)		田中 幸子
III-2-4en Name (LAST, First)		TANAKA, Sachiko
III-2-5ja あて名:		444-0802 日本国 愛知県 岡崎市 美合町五本松 6 1 番地
III-2-5en Address:		61, Gohonmatsu, Miai-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-0802 Japan
III-2-6 国籍(国名)		日本国 JP
III-2-7 住所(国名)		日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja 氏名(姓名)		稲垣 善茂
III-3-4en Name (LAST, First)		INAGAKI, Yoshishige
III-3-5ja あて名:		444-0851 日本国 愛知県 岡崎市 久後崎町宮下 2 城南ハイツ 105
III-3-5en Address:		Jonanhaitsu 105, 2, Miyashita, Kugosaki-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-0851 Japan
III-3-6 国籍(国名)		日本国 JP
III-3-7 住所(国名)		日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja 氏名(姓名)		石田 敬
IV-1-1en Name (LAST, First)		ISHIDA, Takashi
IV-1-2ja あて名:		105-8423 日本国 東京都 港区虎ノ門 三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
IV-1-2en Address:		A. AOKI, ISHIDA & ASSOCIATES Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8423 Japan
IV-1-3 電話番号		03-5470-1900
IV-1-4 ファクシミリ番号		03-5470-1911



11-11-11

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

H794-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月24日（24. 08. 2000）木曜日 17時03分11秒

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)	
IV-2-lja	氏名	鶴田 準一; 福本 積; 西山 雅也	
IV-2-len	Name(s)	TSURUTA, Junichi; FUKUMOTO, Tsumoru; NISHIYAMA, Masaya	
V	国の指定		
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国	
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AU CA JP NZ US	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4. 9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権 主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年08月24日 (24. 08. 1999)	
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-236800号	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	5	-
VIII-2	明細書 (配列表を除く)	19	-
VIII-3	請求の範囲	2	-
VIII-4	要約	1	styh794. txt
VIII-5	図面	3	-
VIII-6	明細書の配列表	39	-
VIII-7	合計	69	



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年08月24日 (24. 08. 2000) 木曜日 17時03分11秒

|         | 添付書類                          | 添付                         | 添付された電子データ    |
|---------|-------------------------------|----------------------------|---------------|
| VIII-8  | 手数料計算用紙                       | ✓                          | -             |
| VIII-9  | 別個の記名押印された委任状                 | ✓                          | -             |
| VIII-15 | 計算機読取可能な媒体によるメモ及び/又はアミノ酸配列リスト |                            | 別個のフレキシブルディスク |
| VIII-16 | PCT-EASYディスク                  | -                          | フレキシブルディスク    |
| VIII-17 | その他                           | 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面    | -             |
| VIII-17 | その他                           | 陳述書                        | -             |
| VIII-17 | その他                           | フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面 | -             |
| VIII-18 | 要約書とともに提示する図の番号               |                            |               |
| VIII-19 | 国際出願の使用言語名:                   | 日本語 (Japanese)             |               |
| IX-1    | 提出者の記名押印                      |                            |               |
| IX-1-1  | 氏名(姓名)                        | 石田 敬                       |               |
| IX-2    | 提出者の記名押印                      |                            |               |
| IX-2-1  | 氏名(姓名)                        | 鶴田 準一                      |               |
| IX-3    | 提出者の記名押印                      |                            |               |
| IX-3-1  | 氏名(姓名)                        | 福本 積                       |               |
| IX-4    | 提出者の記名押印                      |                            |               |
| IX-4-1  | 氏名(姓名)                        | 西山 雅也                      |               |

## 受理官庁記入欄

|        |  |        |
|--------|--|--------|
| T0-1   | 国際出願として提出された書類の実際の受理の日                                   |        |
| T0-2   | 函面:  |        |
| 10-2-1 | 受理された  |        |
| 10-2-2 | 不足函面がある  |        |
| T0-3   | 国際出願として提出された書類を補完する書類又は函面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日) |        |
| T0-4   | 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日                          |        |
| T0-5   | 出願人により特定された国際調査機関  | ISA/JP |
| T0-6   | 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない                         |        |





## 特許協力条約に基づく国際出願願書

H794-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月24日（24. 08. 2000）木曜日 17時03分11秒

## 国際事務局記入欄

|      |           |  |
|------|-----------|--|
| II-1 | 記録原本の受理の日 |  |
|------|-----------|--|



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05722

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, PIR/Swissprot

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.),<br>27 October, 1994 (27.10.94)<br>& AU, 9465592, A & EP, 711347, A1<br>& US, 5534660, A & JP, 9-500006, A<br>& AU, 686155, B & EP, 711347, A4<br>& US, 5910627, A                                 | 1, 7-14               |
| A         | Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the<br>Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger gene in Oryza sativa" Biochim. Biophys.<br>Acta (July, 1999), Vol. 1446, pp.149-155  | 1-14                  |
| A         | Gaxiola, A.R. et al. "The Arabidopsis thaliana proton<br>transporters, AtNhxl and Avp1, can function in cation<br>detoxification in yeast", Proc. Natl. Acad. Sci. USA<br>(February, 1999), Vol.96, pp.1480-1485                                 | 1-14                  |
| A         | Lu, P. Y. et al., "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a<br>glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional<br>definition of a plant ATP-binding cassette transporter<br>gene," Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997), Vol.94,<br>pp.8243-8248 | 1-14                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

|   |   |
|---|---|
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not<br>considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing<br>date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is<br>cited to establish the publication date of another citation or other<br>special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other<br>means<br>"P" document published prior to the international filing date but later<br>than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or<br>priority date and not in conflict with the application but cited to<br>understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be<br>considered novel or cannot be considered to involve an inventive<br>step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be<br>considered to involve an inventive step when the document is<br>combined with one or more other such documents, such<br>combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |
|---|---|

Date of the actual completion of the international search  
27 November, 2000 (27.11.00)

Date of mailing of the international search report  
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05722

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | Marrs, A. K. et al., "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995), Vol. 375, No.6530, pp.397-400 | 1-14                  |
| T         | Tanaka, S. et al., "Colour-enhancing protein in blue petals," Nature (October, 2000), Vol.407, p.581   | 1-14                  |

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

|                                   |   |                                |
|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 H 7 9 4 - P C T | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)<br>及び下記5を参照すること。 |                                |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 0 0 / 0 5 7 2 2 | 国際出願日<br>(日.月.年) 2 4 . 0 8 . 0 0                        | 優先日<br>(日.月.年) 2 4 . 0 8 . 9 9 |
| 出願人(氏名又は名称)<br>サントリー株式会社          |   |                                |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/29, C07K14/415, C12N5/10, A01H5/00,  
C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, PIR/Swissprot

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X               | WO, 94/23561, A1 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORP.) 27. 10月. 1994 (27. 10. 94) & AU, 9465592, A & EP, 711347, A1 & US, 5534660, A & JP, 9-500006, A & AU, 686155, B & EP, 711347, A4 & US, 5910627, A | 1, 7-14          |
| A               | Fukuda, A. et al. "Molecular cloning and expression of the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger gene in <i>Oryza sativa</i> " Biochim. Biophys. Acta (1999, Jul.) 第1446巻 p. 149-155        | 1-14             |
| A               | Gaxiola, A. R. et al. "The <i>Arabidopsis thaliana</i> proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999, Feb.) 第96巻       | 1-14             |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488





| C (続き) : 関連すると認められる文献 |   |                  |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|                       | p. 1480-1485  |                  |
| A                     | Lu, P. Y. et al. "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene"<br>Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 第94巻 p. 8243-8248 | 1-14             |
| A                     | Marrs, A. K. et al. "A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2" Nature (1995) 第375巻 第6530号 p. 397-400  | 1-14             |
| T                     | Tanaka, S. et al. "Colour-enhancing protein in blue petals"<br>Nature (2000, Oct.) 第407巻 p. 581   | 1-14             |

